

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 31.05.77 (21) 2491239/23-04

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 30.04.79. Бюллетень № 16

Дата опубликования описания 30.04.79

(11) 659573

THE BRITISH LIBRARY

7 SEP 1979

SCIENCE REFERENCE LIBRARY

(51) М. Кл.²

С 07 Н 21/02
А 61 К 29/00

(53) УДК 547.963.3.
.541.69(088.8)

(72) Авторы
изобретения

С.М.Женодарова, В.А.Поротикова, В.П.Клягина и Р.И.Жданов

(71) Заявители

Институт биологической физики АН СССР
и Научно-исследовательский институт по биологическим
испытаниям химических соединений

(54) СПИН-МЕЧЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ
КАК СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
ФЕРМЕНТОВ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

1

Данное изобретение относится к новому способу получения новых спин-меченых производных олигорибонуклеотидов общей формулы NpN , NpN'' и $NpN''N$ где Np и N - нуклеотиды и нуклеозиды пиримидинового и пуринового ряда, Np и N'' - производные аденозин-3-фосфата или цитидин-3-фосфата и соответственно цитидина, содержащие спиновую метку в виде остатка 1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролина в качестве заместителя по амино-группе аденина или цитозина, являющихся спиновыми зондами для исследования механизма действия ферментов, катализирующих различные превращения рибонуклеиновых кислот, и определения их содержания в организме.

Известны спин-меченые монорибонуклеотиды, которые применяются в качестве спиновых зондов для изучения Na , K -аденозинтрифосфатазы [1]. Известные спин-меченые рибонуклеотиды являются либо моно-, либо полирибонуклеотидами и являются спиновыми зондами для определенных ферментов.

Цель изобретения - синтез новых спин-меченых производных олигорибонуклеотидов, расширяющих арсенал

2

средств исследования механизма действия ферментов.

Известен способ получения спин-меченых монорибонуклеотидов, в частности спин-меченых аденозинтрифосфатов, по 2' (3')-гидроксильной группе действием имидазолида кислоты-радикала на водные растворы нуклеотидов [2]. Однако этим методом трудно получить спин-меченые олигорибонуклеотиды из-за неустойчивости имидазолида кислоты-радикала.

Поставленная цель достигается путем использования в качестве спин-меченых производных нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов и проведения реакции при участии соответствующих ферментов.

Настоящий способ получения спин-меченых производных олигорибонуклеотидов заключается в том, что спин-меченые нуклеозид-2', 3'-циклофосфаты или нуклеозиды пиримидинового и пуринового ряда подвергают взаимодействию соответственно с нуклеотидами или нуклеотидами при температуре 0-4°C в присутствии специфических рибонуклеаз в соответствующем буферном растворе с последующим взаимодействием при температуре 36-37°C

полученных спин-меченых динуклеозид-монофосфатов с нуклеозид-5-дифосфатами при участии полинуклеотидфосфорилазы в трис-буфере при pH 9,0-9,2.

Получение исходных веществ.

Пример 1. N^6 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-аденозин-2'(3')-фосфат.

К суспензии 0,2 г (0,47 м) Ру-соли аденозин-2'(3')-фосфата в 3 мл абсолютного пиридина добавляют хлорангидрид, полученный из 1,1 г 2,2,5,5-тетраметил-3-карбокси-пирролин-1-оксида, в 2,5 мл абсолютного пиридина при охлаждении в бане из сухого льда и ацетона. Образовавшийся раствор оставляют при комнатной температуре на 3,5 ч. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают абсолютным пиридином. К охлажденному фильтрату добавляют 3,5 мл дистиллированной воды и раствор экстрагируют три раза хлороформом (20, 10, 5 мл). Хлороформный слой сушат безводным Na_2SO_4 и упаривают досуха при комнатной температуре. К осадку добавляют 8 мл 50%-ного водного пиридина, раствор охлаждают, приливают 7 мл предварительно охлажденного 2 н. NaOH и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем быстро добавляют Дауэкс 50x4 (100-200 меш) в Ру-форме до pH 7,5. Смола отфильтровывают и промывают тремя объемами 2 М водного пиридина. Фильтрат и каждую из промывок пропускают через колонку с 40 мл свежего Дауэкс 50x4 (100-200 меш) в Ру-форме. Объединенные промывки упаривают при добавлении пиридина до выпадения осадка кислоты. Из этой смеси (pH 6-7) кислоту-радикал экстрагируют эфиром (~100 мл). Водный раствор упаривают на роторе при комнатной температуре досуха. Получают 0,19 г спин-меченого производного, загрязненного исходным нуклеотидом. Далее очистку проводят методом препаративной ВХ в системе (А). Выход 60%; R_f 0,61 (А); $U_{отн}$ 0,86; УФ-спектр: λ_{max} 260, 303 нм.

Пример 2. N^4 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин-2'(3')-фосфат получают аналогично описанному в примере 1. Время гидролиза перацетильного производного 30 мин. Выход 70%; R_f 0,69 (А); $U_{отн}$ 0,87; УФ-спектр: λ_{max} 260, 303 нм.

Пример 3. N^4 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин получают аналогично описанному в примере 1. Очистку проводят методом препаративной ТСХ на пластинках из силуфола в системе н-бутанол, насыщенный водой. С адсорбента спин-меченый цитидин элюируют этанолом. Выход 60%; R_f 0,84 (Б); $U_{отн}$ 1,12. Т.пл. 132-134°. УФ-спектр: λ_{max} 260, 303 нм. Спектр ЭПР (хлоро-

форм): a_H 15,6; содержание спинов: $5,8 \cdot 10^{23}$ спин/моль. Для $C_{18}H_{25}N_4O_7$ вычислено, %: С 52,80; Н 6,16; N 13,68.

Найдено, %: С 53,19; 52,97; Н 6,45; 6,35; N 13,93; 13,81.

Пример 4. N^4 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин-2',3'-циклофосфат. 153 о.е. (8 мкМ) спин-меченого цитидин-2(3)-фосфата растворяют в 1 мл воды, доводят pH раствора 0,1 н. HCl до 6,0 и добавляют 25 мг п-толуолсульфоната циклогексил- β -(N-(N-метилморфолина))-этилкарбодиамида. Реакционную смесь оставляют на 4 ч при комнатной температуре, поддерживая pH равным примерно 6,0. Затем реакционную смесь упаривают досуха на роторе. Остаток промывают несколько раз эфиром, после чего растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и делают методом препаративного электрофореза на бумаге. После обессоливания в системе этанол:вода-7:3 получают 85 о.е. (56%) хроматографически чистого циклофосфата. R_f 0,91 (А); $U_{отн}$ 0,62; УФ-спектр: λ_{max} 260, 303 нм.

Пример 5. N^6 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-аденозин-2,3-циклофосфат получают аналогично описанному в примере 4. Выход 52%; R_f 0,85 (А); $U_{отн}$ 0,64; УФ-спектр: λ_{max} 282 нм.

Получение целевого продукта.

Пример 6. N^4 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидилил-(3 \rightarrow 5')-цитидин. 136 о.е. (8 мкМ) спин-меченого цитидин-2',3'-циклофосфата и 80 мкМ цитидина в 0,16 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (pH 7,6), содержащего панкреатическую рибонуклеазу в концентрации 0,16 мг/мл, инкубируют при 0-4°C около двух недель. Спин-меченый цитидилил-(3 \rightarrow 5')-цитидин выделяют методом препаративного электрофореза на бумаге. Дополнительную очистку проводят, хроматографируя в системе (Б). Получают 23 о.е. (30%). R_f 0,84 (А); $U_{отн}$ 1,58; УФ-спектр: λ_{max} 262, 303 нм.

Пример 7. Гуанилил-(3' \rightarrow 5')- N^4 -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин. 60 мкМ гуанозин-2',3'-циклофосфата (гуанидиниевая соль) и 180 мкМ спин-меченого цитидина в 6 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего рибонуклеазу Т в концентрации 50 ед. акт/мл, инкубируют в течение 5-6 ч при 0°C. Затем реакционную смесь делают методом препаративного электрофореза на бумаге. Полосы, содержащие спин-меченый гуанилил-(3' \rightarrow 5')-цитидин, пришивают к новым листам бумаги и хромат графруют в системе В. Получают 153 о.е. (~5 мкМ). Выход 20%; R_f 0,7 (Б); $U_{отн}$ 1,5; УФ-спектр: λ_{max} 259, 302 нм.

Пример 6. Гуанилил-(3→5)-
-N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-
карбонилпирролин, -цитидил-(3→5)-
-уридин. 145 о.е. (5 мкМ) GrC^m,
2,5 мкМ уридин-5'-дифосфата (динат-
риевая соль) и 3 мг ПНФ-азы М.
Iysodeiticus растворяют в 0,5 мл
0,05 М трис-HCl-буфера (рН 9,0-9,2),
содержащего 0,01 М MgCl₂ и 0,05 мм
ЭДТА, и инкубируют при 36-37°C. Че-
рез 2 ч всю реакционную смесь нано-
сят на бумагу и хроматографируют в
системе Б. Полосы, соответствующие
различным компонентам реакционной
смеси, элюируют водой и дополнитель-
но очищают с помощью электрофореза
и хроматографии в системе А. Полу-
чают 10 о.е. (15%) GrCp^mU(Rp(Ur)
1,55 (А); U_{отн} 0,65; УФ-спектр: λ_{макс}
259, 307 нм) и 5 о.е. GrCp^mUpU
(R₁(Ur) 1,02 (А); U_{отн} 0,68; УФ-спектр:
λ_{макс} 259, 307 нм).

Хроматографию и электрофорез прово-
дят на бумаге марки ленинградская М
и FN-3. При хроматографии ис-
пользуют следующие системы раствори-
телей: этанол - 1 М ацетат аммония
(рН 7,5), 7:3 (А); этанол - концент-
рированный аммиак - вода-65:10:25
(Б); изопропанол-концентрированный
аммиак - вода-7:2:1 (В). Электрофо-
рез на бумаге проводят в приборе
для вертикального электрофореза фир-
мы "Labor" (Венгрия) в течение 2 ч
с градиентом напряжения 20 В/см в 0,05М
триэтиламонийбикарбонате, рН 7,5.

Формула изобретения

1. Спин-меченные производные олиго-
рибонуклеотидов общей формулы NpN ,

NpN" и NpNpN, где Np и N" - нукле-
отиды и нуклеозиды пиримидинового и
пуринового ряда; Np и N" - производные
аденозин-3-фосфата или цитидин-3-
фосфата и соответственно цитидина,
содержащие спиновую метку в виде
остатка 1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-
3-карбонилпирролина в качестве
заместителя по амино-группе аденина
или цитозина, как спиновые зонды для
исследования механизма действия фер-
ментов.

2. Способ получения соединения
по п.1, отличающийся тем,
что спин-меченные нуклеозид-2',3'-цикло-
фосфаты или нуклеозиды пиримидиново-
го и пуринового ряда подвергают взаимо-
действию соответственно с нуклеози-
дами или нуклеотидами при температу-
ре 0-4°C в присутствии специфических
рибонуклеаз в соответствующем буфер-
ном растворе с последующим взаимодей-
ствием при температуре 36-37°C полу-
ченных спин-меченных динуклеозидмоно-
фосфатов с нуклеозид-5-дифосфатами
при участии полинуклеотидфосфорилазы
в трис-буфере при рН 9,0-9,2.

Источники информации, приняты
во внимание при экспертизе

1. Сухоруков Б.И., Петров А.И.
Спин-меченные нуклеозиды, нуклеозид-
-5-моно-, ди- и -трифосфаты. - "Био-
физика", 1975, 20, с.965.

2. Табак М., Рууге Э.К., Смирно-
ва И.Н., Петров А.И., Сухоруков Б.И.,
Твердислов В.А. Взаимодействие мемб-
ранного препарата Na, К-АТФ-азы со
спин-меченым аналогом АТФ. - "Био-
химия", 1977, 42, № 3, с. 476.

Составитель Л.Никулина

Редактор В.Минасбекова Техред И.Асталом

Корректор Н.Стец

Заказ 2114/4

Тираж 512

Подписное

ЦНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретения и открытия

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д.4/5

Филиал ППП "Патент", г.Ужгород, ул. Проектная, 4